Aus der Abteilung Laboratoriumsdiagnostik
der Stoffwechsel- und Hormonkrankheiten
Direktor: Professor Dr. D. Gupta F.R.C. Path.
der Kinderklinik der Universität Tübingen

IN VITRO UNTERSUCHUNG DER TESTOSTERON-BIOKONVERSION BEI BENIGNER PROSTATA HYPERPLASIE UND PROSTATAKARZINOM

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnheilkunde

der Medizinischen Fakultät
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von

Thomas Springer
aus Hechingen

1984

VEREIN
KUNSTLER
GES.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41536515_0010

Aus der Abteilung Laboratoriumsdiagnostik
der Stoffwechsel- und Hormonkrankheiten
Direktor: Professor Dr. D. Gupta F.R.C. Path.
der Kinderklinik der Universität Tübingen

IN VITRO UNTERSUCHUNG DER TESTOSTERON-BIOKONVERSION BEI BENIGNER PROSTATA HYPERPLASIE UND PROSTATAKARZINOM

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnheilkunde

der Medizinischen Fakultät
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von

Thomas Springer
aus Hechingen

1984

Dekan: Professor Dr. H. D. Waller
1. Berichterstatter: Professor Dr. D. Gupta
2. Berichterstatter: Professor Dr. R. Harzmann

Offsetdruck Spengler
Lessingstraße 4 · 7401 Neustetten 1
Telefon (0 74 72) 2 21 45

Für meine Eltern

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

1.	EINLEITUNG	1
2.	FRAGESTELLUNG	6
3.	METHODE	7
3.1.	Verarbeitetes Prostatagewebe	7
3.2.	Materialien	11
3.2.1.	Substrat	11
3.2.2.	Standards	11
3.2.3.	Inkubationsmedium	11
3.2.4.	Lösungsmittel etc.	12
3.2.5.	Meßgeräte	12
3.3.	Inkubation	13
3.4.	Extraktion	14
3.5.	Chromatographische Auftrennung	15
3.5.1.	Erster Trennungslauf	15
3.5.1.1.	Scannen der Dünnschichtchromatographie-folien	17
3.5.1.2.	Messung der Radioaktivität	19
3.5.2.	Zweiter Trennungslauf	20
4.	ERGEBNISSE	23
4.1.	Versuchsergebnisse bei Zusatz von Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase zum Inkubationsmedium	23
4.2.	Versuchsergebnisse ohne Zusatz von Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase zum Inkubationsmedium	25
4.2.1.	Testosteron-Biokonversion über den 17-OH-Weg	29
4.2.1.1.	Biokonversion von Testosteron zu Di-hydrotestosteron	29

4.2.1.2.	Biokonversion von Testosteron zu Androstandiol	31
4.2.2.	Testosteron-Biokonversion über den 17-Keto-Weg	32
4.2.2.1.	Biokonversion von Testosteron zu Androstandion	32
4.2.2.2.	Biokonversion von Testosteron zu Androsteron	33
4.2.2.3.	Biokonversion von Testosteron zu Androstendion	34
4.2.3.	Nicht metabolisiertes Testosteron	35
4.3.	Vergleich der hier vorliegenden Ergebnisse mit denen von Grun	36
5.	DISKUSSION	38
5.1.	5-alpha-Reduktase-Aktivität	38
5.2.	3-alpha-Hydroxy-Steroiddehydrogenase-Aktivität	42
5.3.	17-beta-Hydroxy-Steroiddehydrogenase-Aktivität	45
5.4.	Der Einfluß der Methode der Gewebeprobengewinnung auf die Untersuchungsergebnisse	47
5.5.	Quantitativer Vergleich der vorliegenden Versuchsergebnisse mit denen anderer Autoren	48
6.	ZUSAMMENFASSUNG	50
7.	LITERATURVERZEICHNISS	51

1. E I N L E I T U N G

Die embryonale Differenzierung, der Wachstumsschub während der sexuellen Reifeperiode und die sekretorische Funktion der Prostata stehen unter der Kontrolle testikulärer Androgene. Bei embryonalen Testosteronverwertungsstörungen (5-alpha-Reduktasedefekt) wird die Prostata nicht ausgebildet.
Testosteron wird hauptsächlich von Hoden und Nebennierenrinde gebildet und sezerniert. Testosteron selbst ist jedoch nicht das physiologische Endhormon, sondern fungiert als zirkulierendes Prohormon, aus dem auf zwei verschiedene Arten seine Metabolite gebildet werden. Zum einen ist die Umwandlung in wirksamere Androgene, zum anderen die Bildung eines Östrogens möglich.
Das Wirkhormon am akzessorischen Geschlechtsorgan Prostata ist jedoch das Dihydrotestosteron (DHT).

Testosteron ist im Serum an ein Transportglobulin, das Sex-Hormon bindende Globulin (SHBG) gebunden. Nach Entkopplung vom SHBG und Eintritt in die Zelle wird Testosteron zu Dihydrotestosteron reduziert. DHT wird im Zytoplasma an ein Rezeptorprotein gebunden, aktiviert und in den Zellkern eingeschleust. Der DHT-Rezeptor-Komplex bewirkt eine Transskription spezifischer Strukturgene mit anschließender Nucleinsäurebildung und Induktion der zytoplasmatischen Proteinneosynthese zur Regulation des Sekretions- und Wachstumszustandes der Prostata.
Testosteron vermittelt die androgen-determinierende Botschaft erst über sein Stoffwechselprodukt Dihydrotestosteron (15).
Abbildung 1 zeigt diejenigen Androgene, die in der Prostata aus Testosteron metabolisiert werden.

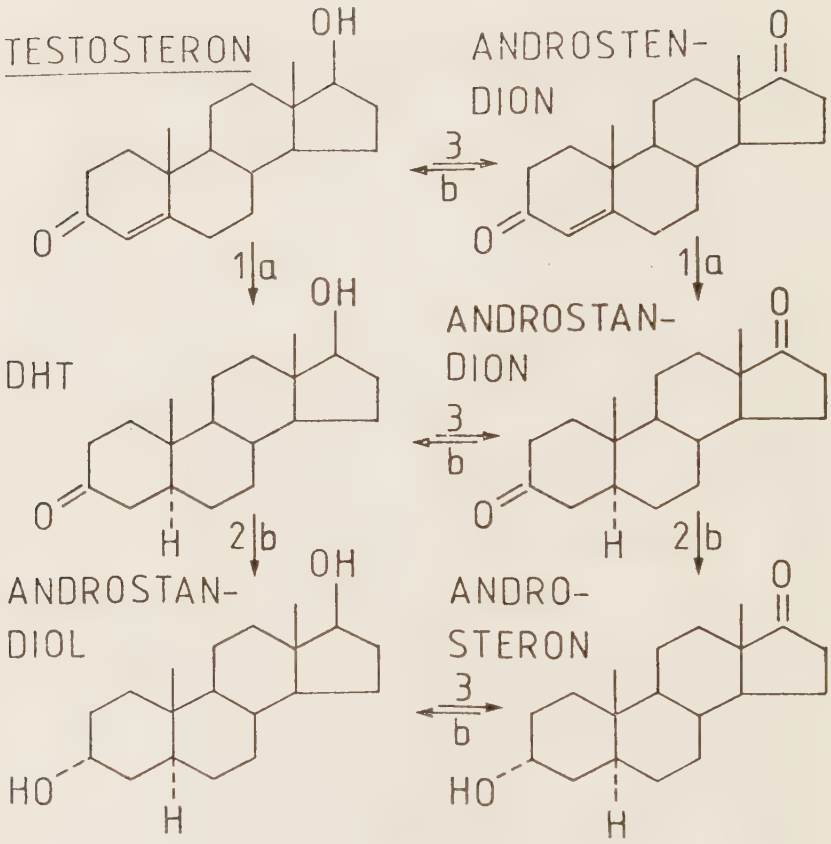

Abbildung 1: Metabolisierung von Testosteron

1 = Steroid-5-alpha-Reduktase
2 = 3-alpha-Hydroxy-Steroiddehydrogenase
3 = 17-beta-Hydroxy-Steroid-dehydrogenase
a = H_2
b = NADPH + H^+

Bereits Huggins stellte 1947 fest, daß die benigne Prostata Hyperplasie (BPH) unter Einfluß von Androgenen und fast ausschließlich im höheren Alter entsteht (12). Wobei die Zeitkomponente ein Ausdruck andauernder Stimulation durch Androgene über viele Jahre hinweg ist, und im Alter das Gleichgewicht der Hormone gestört wird.

Die BPH geht von den submukösen Drüsen der hinteren Harnröhre aus, wobei das eigentliche Prostatagewebe durch das zentrale Wachstum dieser Neubildung von innen heraus abgeflacht wird und im Endstadium dem Adenom schalenförmig aufsitzt (1).
Im Blut von BPH-Patienten ist die Dihydrotestosteron-Konzentration gegenüber gesunden Patienten signifikant erhöht (25).
Die BPH zeichnet sich histologisch durch eine starke Zunahme des Stromas aus. Sein Anteil beträgt 60 Volumen% gegenüber 45 Volumen% bei der gesunden Prostata (3).
Die 5-alpha-Reduktase, die die Umwandlung von Testosteron in Dihydrotestosteron katalysiert, ist ein vornehmlich stromales Enzym (15); dadurch läßt sich die erhöhte Dihydrotestosteron-Konzentration erklären.

Die Ätiologie des Prostatakarzinoms konnte noch nicht geklärt werden (14). Es werden zwei Möglichkeiten diskutiert. Zum einen könnte das veränderte Enzym- und Rezeptormuster der Prostatazellen die Bildung eines Karzinoms induzieren. Zum anderen könnte das veränderte Enzymgefüge auch eine Folge des Karzinoms sein, das seinerseits durch exogene Ursachen entstanden ist.
Im Tierexperiment ist es bisher nicht gelungen, durch Stimulation mit verschiedenen Steroidkombinationen ein Prostatakarzinom zu induzieren.

Die Enzymaktivität im Prostatakarzinom unterscheidet sich signifikant von derjenigen in gesunden oder adeno-

matösen Prostatageweben, wobei das Ausmaß der Veränderung möglicherweise mit dem Entdifferenzierungsgrad der Karzinomzellen in Zusammenhang steht (11, 22, 14, 21, 17, 7, 13).

Prostatkarzinomgewebe zeigten bei verschiedenen Autoren gegenüber normalem und BPH-Gewebe eine geringere Biokonversionsrate von Testosteron zu DHT (17, 21, 28).
Es wurde ebenfalls festgestellt, daß die Bildung von DHT in Karzinomgewebe von Patienten, bei denen bereits eine gegengeschlechtliche Hormontherapie versucht wurde, stark vermindert ist (2, 16).

Histologisch zeigten die Azini von Karzinomgeweben zwei verschiedene Typen von Basalzellen: Typ I (helle) und Typ II (dunkle) Zellen.
Dies scheint für die hormonelle Östrogentherapie des Prostatakarzinoms von Bedeutung zu sein, denn in Karzinomen, die auf eine Östrogenbehandlung nicht ansprachen, waren die Typ II Zellen vermehrt (27).

Es scheintdaher wichtig, die Erkenntnisse über die Testosteron-Biokonversion in Prostatagewebe zu verbessern, um dadurch vielleicht die Patienten, die auf eine Hormontherapie ansprechen, von denen, die auf eine solche Behandlung nicht reagieren, unterscheiden zu können (28).

Bezüglich der Gewinnung von Gewebeproben gibt es zwei verschiedene Methoden.
Zum einen die transurethrale Resektion mit der Elektroschlinge, zum anderen die offene Prostatektomie mit dem Skalpell. Bei der erstgenannten Methode wäre es möglich, daß das Gewebe bei der Entnahme eine Veränderung durch Koagulation erfährt, was bei der zweitgenannten Methode praktisch ausgeschlossen ist.

Grun (10) untersuchte die Enzymaktivität von normalem Drüsen- und Adenomgewebe von BPH-Trägern und Drüsen-, Adenom- und Karzinomgewebe von Prostatakarzinomträgern anhand von Gewebsproben, die durch transurethrale Resektion gewonnen worden waren. Er fand dabei, daß in Karzinomgewebe die Enzymaktivität signifikant niedriger ist als in Drüsen- und Adenomgewebe.

2. F R A G E S T E L L U N G

In der vorliegenden Arbeit sollen deshalb folgende Fragen untersucht werden:

1.) Unterscheidet sich normales Drüsengewebe und Adenomgewebe von BPH-Trägern hinsichtlich der Testosteron-Biokonversion von dem karzinom-begleitenden Drüsen- und Adenomgewebe, bzw. von dem hoch- und wenig-differenzierten Adeno-karzinomgewebe des Prostatakarzinomträgers?

2.) Unterscheidet sich unser Karzinomkollektiv von dem meist fortgeschrittenen, wenig bzw. entdifferenzierten Karzinomen des Grun'schen Kollektives?

3.) Unterscheiden sich die Versuchsergebnisse von Gewebeproben, die mit dem Enzym Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase inkubiert wurden, von solchen Proben, die ohne dieses Enzym verar-beitet wurden?

4.) Hat die Methode der Gewinnung der Gewebeproben einen Einfluß auf die Ergebnisse der In-vitro-Untersuchungen?

3. METHODE

Die im folgenden beschriebene Methode wurde aus den Inaugural-Dissertationen von Stefan Grumbach (9a) und Wolfgang Grun (10) übernommen und in einigen Teilen modifiziert.

3.1. Verarbeitetes Prostatagewebe

Das im vorliegenden Versuch verarbeitete Prostatagewebe wurde an der Abteilung für Urologie der Universitätskliniken Tübingen gewonnen. Es handelte sich dabei um ausschließlich durch suprapubische transvesikale Prostatektonie gewonnenes Material. Diese Gewebsproben wurden in einzelne Späne von ca. 1 - 1,5 cm Länge und ca. 0,5 cm Breite und Höhe zerteilt. Diese Späne wiederum wurden, wie das Schema in Abbildung 2 zeigt, in fünf Teile zerschnitten. Die beiden mit "B" bezeichneten Stücke wurden am Pathologischen Institut der Universität Marburg (Prof. Dr. P. Schmitz-Moormann) hinsichtlich folgender Kriterien untersucht:

- Zuordnung zu Drüsen-, Adenom- oder Karzinomgewebe
- deren prozentualer Anteil
- beim Karzinom zusätzlich:
  Histologisches Grading in hoch- und wenig differenziertes Adenokarzinom, cribriformes und solide-anaplastisches Karzinom.
  Zytologisches Grading in geringe, mäßige und starke Kernaplasie.

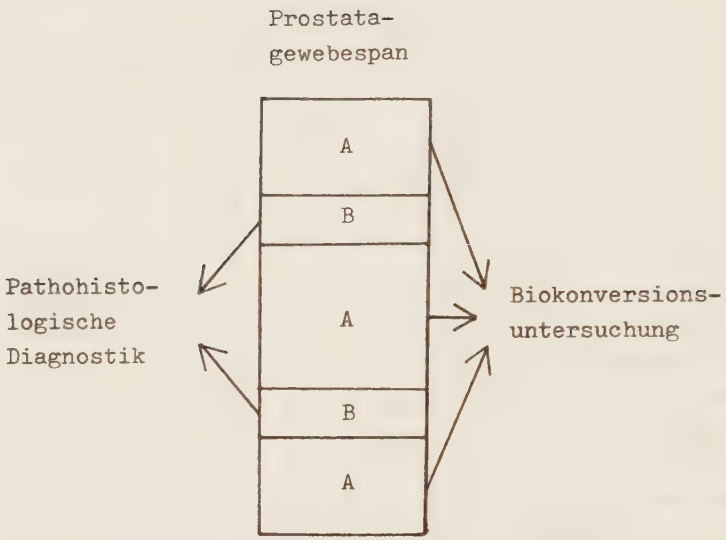

Abbildung 2: Methode der histologischen Identifizierung der Prostatagewebespäne (nach Flüchter).

Zeigten die beiden mit "B" bezeichneten Stücke des Spanes die gleiche histologische Diagnose, so wurden die Stücke "A" für die Biokonversionsversuche herangezogen und bis zur ihrer Verarbeitung bei -60° C gelagert.

Insgesamt wurden 90 Gewebsspäne von 12 verschiedenen Patienten untersucht. Von diesen 12 Patienten waren 7 Adenom- und 5 Karzinomträger.

Die Adenomträger (benigne Prostata-Hypertrophie = BPH) waren zwischen 53 und 80 Jahren, im Durchschnitt 69,5 Jahre alt. Aus dieser Gruppe wurden 6 Gewebsspäne mit der histologischen Diagnose "Drüsengewebe" und 41 Späne mit der histologischen Diagnose "Adenomgewebe" untersucht.

Die Karzinomträger waren zwischen 49 und 69 Jahren, im Durchschnitt 58,5 Jahre alt. Innerhalb dieser Gruppe muß unterschieden werden zwischen:

- Einem Patienten mit einem Incidental-Karzinom, das als histologischer Zufallsbefund während einer Adenomoperation festgestellt wurde. Von diesem Patienten wurden 3 Späne mit der histologischen Diagnose "Drüsengewebe" und 4 Späne mit der histologischen Diagnose "Adenomgewebe" untersucht.
- 4 Patienten mit einem virginellen Karzinom, das schon vor der Operation klinisch diagnostiziert wurde, jedoch noch keiner Therapie unterworfen war. Aus dieser Gruppe wurden 7 Späne mit der Diagnose "Drüsengewebe", 14 Späne mit der Diagnose "Adenomgewebe" und 15 Späne mit der Diagnose "Karzinomgewebe" untersucht.

In verschiedenen Gewebsspänen eines einzelnen Patienten wurden aufgrund der Morphologie der Prostata meist mehrere histologische Diagnosen gefunden. So kann in der Prostata eines Adenomträgers sowohl Drüsen-, als auch Adenomgewebe gefunden werden. In der Prostata eines Karzinom-

trägers kann neben Drüsen- und Adenomgewebe auch Karzinomgewebe der verschiedenen Differenzierungsgrade gefunden werden.
Tabelle 1 gibt eine Übersicht über alle Gewebsproben, die in dieser Arbeit untersucht wurden.

Patient	Alter	Diagnose	Anzahl der Späne der verschiedenen histologischen Diagnosen						
			D	A	Ca:	I	II	III	IV
SK	56	Adenom	-	7	-				
HR	77	Adenom	1	5	-				
HW	79	Adenom	1	6	-				
WJ	80	Adenom	-	3	-				
BF	53	Adenom	2	7	-				
CH	70	Adenom	1	7	-				
SA	71	Adenom	1	6	-				
BJ	57	Incid.Ca	3	4	-				
BA	59	Virg.Ca	3	3	2	-	2	-	-
HB	69	Virg.Ca	1	3	4	3	1	-	-
SK	49	Virg.Ca	-	-	5	-	5	-	-
FE	59	Virg.Ca	3	8	4	4	-	-	-

Tabelle 1: Anzahl der einzelnen Gewebsproben geordnet nach Patienten und histologischen Diagnosen:
D = Drüsengewebe, A = Adenomgewebe,
Ca = Karzinomgewebe mit den Gradings:
I = hochdifferenziertes Adenokarzinom
II = wenig differenziertes Adenokarzinom
III = cribriformes Karzinom
IV = solides-anaplastisches Karzinom

3.2. Materialien

3.2.1. Substrat

1,2,6,7 - ^{3}H) - Testosteron der spezifischen Aktivität 98,9 Ci/mmol, gelöst in einer 9:1 Benzol-Äthanol-Lösung, stammte von der Firma New England Nuclear, Boston, Mass., USA.
Unmarkiertes Testosteron stammte von der Firma Serva Feinbiochemika & Co, Heidelberg.
0,015 Mg ^{3}H-Testosteron, dies entspricht 5,0 mCi, und 0,135 mg unmarkiertes Testosteron wurden in 50 ml Äthanol gelöst und bis zur Verwendung kühl gelagert.

3.2.2. Standards

Die als Referenzsteroide benutzten Hormone wurden in einer Konzentration von 1 mg/ml Äthanol gelöst und bis zur Verwendung kühl gelagert.
DHT und Androsteron stammten von der Firma E. Merck AG, Darmstadt. Androstandion, Androstandiol und Androsterdion stammten von der Firma Sigma Chemical Co, St. Louis, Missouri, USA.

3.2.3. Inkubationsmedium

Das Inkubationsmedium wurde erst unmittelbar vor der Inkubation angesetzt und bestand aus:
18,0 ml Aqua dest.
2,0 ml steriler Hank'scher Lösung
3,5 ml NADPH Di-Natriumsalz (3,257 µmol/ml H_2O)
3,5 ml G-6-P Di-Natriumsalz (36,17 µmol/ml H_2O)
1,0 ml Hepes-Puffer (20 µmol/ml H_2O)
2,5 ml $NaHCO_3$ 3 %ig
Der pH-Wert des Mediums lag bei 6,9. Bei Schwankungen wurde er mit Hilfe der beiden Pufferlösungen auf 6,9 eingestellt.

Die sterile Hank'sche Lösung und der Hepes-Puffer stammten von der Firma Serva Feinbiochemika GmbH & Co, Heidelberg, NADPH Di-Natriumsalz und $NaHCO_3$ stammten von der Firma E. Merck AG, Darmstadt und das G-6-P Di-Natriumsalz von der Firma Boehringer-Mannheim GmbH, Mannheim. Die Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase der Sonderversuchsreihe stammte von der Firma Fluka AG, Buchs, Schweiz.

3.2.4. Lösungsmittel etc.

Ethanol, Essigsäureethylester, Methanol, n-Hexan, Chloroform, Natronlauge, Aceton, Pyridin, Essigsäureanhydrid, Benzol, Iso-Propanol und Phosphormolybdänsäure stammten von der Firma E. Merck AG, Darmstadt und hatten den Reinheitsgrad "Zur Analyse".
Die Szintillationsflüssigkeit "Unisolve I" stammte von der Firma Zinsser Analytic GmbH, Frankfurt/Main.

3.2.5. Meßgeräte

Die Proben wurden auf einer Analysenwaage Typ 2406 der Firma Sartorius GmbH, Göttingen, gewogen.
Die Messung der pH-Werte erfolgte mit einem pH-Meter Typ E 300 der Firma Metrohm, Herisau, Schweiz.
Die Verteilung der Radioaktivität auf den Dünnschicht-Chromatografiefolien wurde mit einem Dünnschichtscanner Typ LB 2723 der Firma Berthold, Wildbad, bestimmt.
Die Messung der Aktivität der einzelnen chromatographisch getrennten Bereiche erfolgte mit einem Tri-Carb-Szintillation Spectrometer Model 2002 der Firma Packard Company Inc., Downers Grove, Illinois, USA

3.3. Inkubation

Die Gewebsproben wurden bis zu ihrer Verwendung in der Tiefkühltruhe bei -60°C gelagert. Zur Verarbeitung wurden die Proben in gefrorenem Zustand gewogen und anschließend in flüßigem Stickstoff auf -195°C abgekühlt. Danach wurden sie in Teflon-Kapseln überführt und in einem Mikro-Dismembrator Typ 853062 der Firma Braun, Melsungen, pulverisiert. Das Pulver wurde in ein Inkubationsgefäß gegeben und zu je 100 mg Gewebspulver wurden 3 ml Inkubationsmedium und 50 ul Substrat zugesetzt. War die Probe schwerer oder leichter, dann wurdenentsprechend mehr oder weniger Substrat und Medium zugesetzt.
Nun wurden die Proben unter ständigem Schütteln und unter Carbogenzufuhr im Wasserbad eines Dubnoff-Shakers bei 37°C genau 120 Minuten inkubiert.

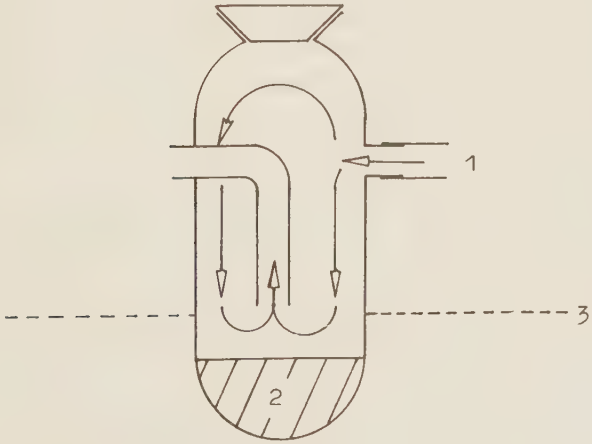

Abbildung 4: Inkubationsgefäß
1 = Carbogenzufuhr
2 = Inkubat
3 = Wasserspiegel im Dubnoff-Shaker

3.4. Extraktion

Nach der Inkubation wurden die Proben zur Hemmung eines weiteren Substratumsatzes in Schliffglasröhrchen überführt. Die bereits 10 ml Essigsäureethylester enthielten. Die Inkubationsgefäße wurden noch je zweimal mit 1 ml Aqua dest. nachgespült und kräftig geschüttelt. Nach Zusatz von je 200 µl der sechs Referenzsteroide wurden die Proben 10 min. bei 175 Bewegungen/min. geschüttelt, sodann in einer Zentrifuge des Typs UJ 3 EX der Firma Martin Christ, Osterode/Harz, zentrifugiert und der Überstand in neue Gefäße überführt. Der Rückstand wurde mit 5 ml warmem Essigsäureethylester nachgewaschen, 10 min. geschüttelt und zentrifugiert. Die beiden Überstände wurden vereinigt und der Essigsäureethylester verdampft.

Zur Entfernung vorhandener Lipide wurde der eingedampfte Rückstand in 5 ml 70%igem Methanol gelöst, 10 ml n-Hexan hinzugefügt und 10 min. bei 175 Bewegungen/min. geschüttelt und dann zentrifugiert. Mit einer Pasteur-Pipette an einer Wasserstrahlpumpe wurde die obere Hexanphase abgesaugt. Die Proben wurden dann zum Ausfrieren der verbliebenen Fette über Nacht in die Tiefkühltruhe gestellt.
Am nächsten Morgen erfolgte in der Tiefkühltruhe die Filtration der ausgefrorenen Fette mit Filtern der Firma Macherey-Nagel & Co, Düren. Die geleerten Probenröhrchen wurden mit 5 ml 70%igem Methanol nachgespült und so lange in die Tiefkühltruhe gestellt, bis die erste Filtration beendet war. Dies war nach durchschnittlich 3-4 Std. der Fall. Dann wurde der Inhalt der Probenröhrchen in die Filter nachgeschüttet und filtriert. Dies dauerte wiederum etwa 3-4 Std.
Nach Eindampfen des Filtrats wurden die Proben mit 10 ml Chloroform versetzt. Zum Entfernen der Östrogene wurde anschließend mit je 0,5 ml 1n NaOH und zweimal

mit je 0,5 ml Aqua dest. geschüttelt, zentrifugiert und die obere Phase mit der Pasteuer-Pipette abgesaugt. Das Chloroform der Proben wurde verdampft. Kurz vor der chromatographischen Auftrennung wurden 100 µl Essigsäureethylester in jedes Probenröhrchen gegeben.

3.5. Chromatographische Auftrennung

Im vorliegenden Versuch wurden die verschiedenen Metabolite, die durch die enzymatische Biokonversion aus Testosteron gebildet wurden, mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie getrennt und identifiziert.

3.5.1. Erster Trennungslauf

Die erste chromatographische Auftrennung der extrahierten Steroide erfolgte auf mit Kieselgel beschichteten DC-Alufolien (20x20 cm) ohne Fluoreszenzindikator mit einer Schichtdicke von 0,25 mm, die von der Firma E. Merck AG, Darmstadt, stammten.
Der Glastank, in dem die Chromatographie durchgeführt wurde, wurde vor jedem Trennungslauf frisch präpariert. Um eine optimale Äquilibrierung des Tanks zu erreichen, wurden die Wände des Tanks mit Filterpapier ausgekleidet. Als Laufmittel diente eine Mischung aus Chloroform : Aceton : Essigsäureethylester im Verhältnis 9 : 1 : 2.
Auftragen der Standards und der Proben:
Auf die DC-Alufolien wurden Bahnen von 2 cm Breite bei einem jeweiligen Abstand von 0,5 cm geritzt. Bei Einhaltung eines Randes auf beiden Seiten fanden so sechs Bahnen auf jeder Folie Platz.
Auf den mittleren Bahnen wurden die in 100 µl Essigsäureethylester gelösten Proben mit Hilfe einer Pas-

teur-Pipette entlang der Startlinie aufgetragen und gleichzeitig gefönt. Dieser Vorgang wurde noch zweimal mit je 100 µl Essigsäureethylester wiederholt. Auf einer der äußeren Bahnen wurde ein Gemisch aus je 50 µl der sechs Referenzsteroide auf der Startlinie aufgetragen. Die Startlinie wurde mit Hilfe einer Plastikschiene festgelegt und befand sich so stets 2,4 cm vom unteren Folienrand entfernt.

In einem Vorversuch wurde die Reihenfolge der sechs Referenzsteroide beim Trennungslauf bestimmt, so daß es nicht notwendig war, für jedes Referenzsteroid eine getrennte Laufbahn zu benutzen.

Trennungslauf:

Nach dem Auftragen der Proben und der Referenzsteroide erfolgte der Trennungslauf im äquilibrierten Glastank. Die Laufzeit betrug etwa 45 Minuten. Die Laufmittelfront lief jeweils bis zum Oberrand der Folie, so daß die Laufstrecke stets 17,6 cm betrug.

Färbung der Standards und Bestimmung der Rf-Werte:

Nach dem Trennungslauf und der Trocknung der Folie wurden die Bahnen mit den Proben gut abgedeckt und die Bahn mit den Referenzsteroiden mit einer 10 %igen Phosphormolybdänsäure-Isopropanol-Lösung besprüht. Die Folie wurde dann etwa 2 Stunden bei 40°C im Trockenschrank des Typs Tv 40 U der Firma Memmert, Schwabach, getrocknet. Die einzelnen Standards wurden dann als blaue Felder sichtbar. Mittelpunkt und Streuung jedes der Felder wurde markiert und die Laufstrecke gemessen. Aus der Laufstrecke des Laufmittels und den Laufstrecken der Standards wurden die Rf-Werte für jedes Steroid errechnet. Dadurch konnte jedem Peak in der Scannerkurve (s.u.) eines oder mehrere Steroide zugeordnet werden. Tabelle 2 zeigt die Rf-Werte und ihre Streuung der sechs Standardsteroide für den jeweils ersten Trennungslauf der einzelnen Proben.

Steroid	Rf	SD	VAR
Androstandiol	0,228	0,017	0,075
Testosteron	0,324	0,021	0,065
DHT/Androsteron	0,411	0,030	0,073
Androstendion	0,494	0,028	0,057
Androstandion	0,635	0,031	0,049

Tabelle 2: Arithmetische Mittel der Rf-Werte (n = 90) der Referenzsteroide nach Dünnschichtchromatographie in Laufmittel Chloroform : Aceton : Essigsäureethylester im Verhältnis 9 : 1 : 2

$$Rf = \frac{\text{Laufstrecke des Steroids}}{\text{Laufstrecke der Lösungsmittelfront}}$$

SD = Standardabweichung

VAR = Varianz

3.5.1.1. Scannen der Dünnschicht-Chromatographiefolien

Um die genaue Lage der einzelnen radioaktiv markierten Hormone auf jeder Bahn der Chromatographiefolie zu bestimmen, wurde diese gescannt. Die sich dabei ergebenden Kurven zeigten in der Regel sieben Spitzen, sog. Peaks verschiedener Größe, die bis auf eine mittels der Rf-Werte einzelnen Hormonen zugeordnet werden konnten. Abbildung 5 zeigt eine typische Scannerkurve mit der Zuordnung der einzelnen Hormone durch deren Rf-Werte.

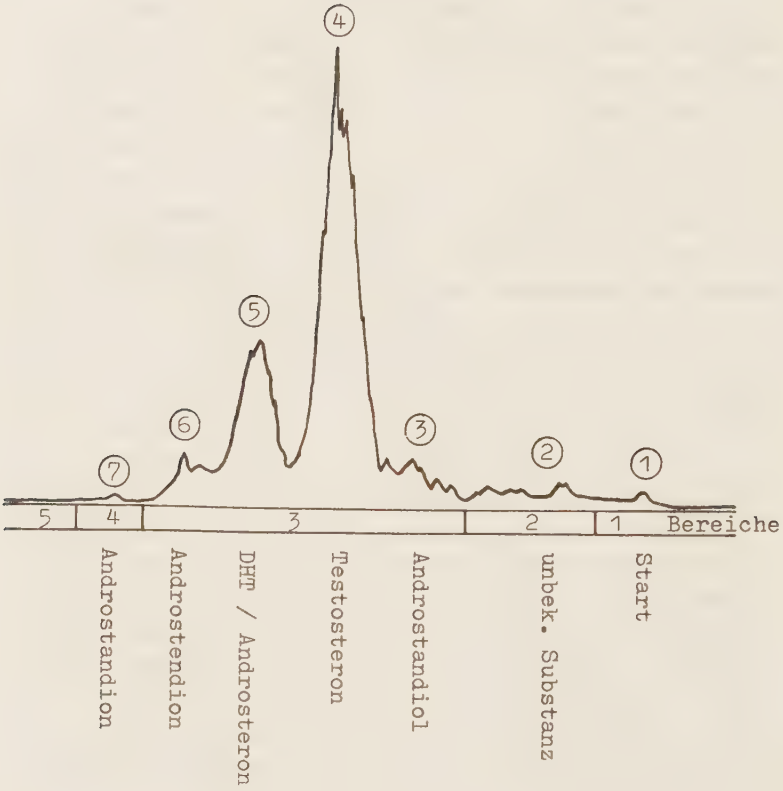

Abbildung 5: Dünnschichtchromatographische Auftrennung der Testosteron-Metabolite im Laufmittel Chloroform : Aceton : Essigsäureethylester im Verhältnis 9 : 1 : 2. Die Scannerkurve zeigt die Lage der radioaktiv markierten Metabolite, die mit Hilfe der gefärbten Standards identifiziert werden konnten.

Peak 1: Am Start blieb oft ein wenig radioaktive Substanz liegen, die einen Peak verursachte.
Peak 2: Konnte keinem der Standardhormone zugeordnet werden und enthielt eine unbekannte Substanz, die polarer war als die übrigen Hormone.
Peak 3: Enthielt Androstaniol und ließ sich oft nicht klar von Peak 4 trennen.
Peak 4: Enthielt Testosteron und überragte in jeder Kurve die anderen Peaks.
Peak 5: Enthielt DHT und Androsteron und war oft etwas breiter als die anderen Peaks.
Peak 6: Enthielt Androstendion und war meist sehr klein.
Peak 7: Enthielt Androstandion und war oft nicht zu erkennen.

Da nicht alle Peaks eindeutig gegen die Umgebung abzugrenzen waren, wurde jede Bahn auf der Chromatographiefolie in fünf Bereiche eingeteilt.

3.5.1.2. Messung der Radioaktivität

Das Kieselgel der einzelnen Bereiche wurde vorsichtig unter dem Abzug von der Chromatographiefolie abgeschabt. Die darin enthaltenen Steroide wurden in Glasfiltern mit 3 ml und anschließend noch einmal mit 2 ml Essigsäureethylester eluiert, wobei das Kieselgel der Bereiche 1 und 5 im gleichen Filter verarbeitet wurde. Die Eluate wurden eingedampft und in jeweils 1 ml Ethanol gelöst. Davon wurden jeweils 100 µl in ein Szintillationsröhrchen mit 10 ml Szintillationsflüßigkeit pipettiert. Im Szintillationszähler wurden die Counts pro Röhrchen zweimal je 5 Minuten ausgezählt.

3.5.2. Zweiter Trennungslauf

Der Bereich 3 der ersten Dünnschichtchromatographie mußte in einem zweiten Trennungslauf aufgetrennt werden. Dazu wurden die restlichen 900 µl des in Ethanol gelösten Eluates dieses Bereichs eingedampft. Ebenso wurde ein Gemisch aus je 20 µl der fünf Standards, die denen im Bereich 3 vorkommenden Steroiden entsprechen, eingedampft. Proben und Standards wurden dann in je 100 µl Pyridin und 100 µl Essigsäureanhydrid gelöst und für 12 - 18 Stunden bei Zimmertemperatur stehengelassen. Danach wurden die Proben und Standards erneut eingedampft.

Trennungslauf:

Der zweite Trennungslauf erfolgte mit den gleichen Dünnschichtchromatographiefolien, die auch in gleicher Weise mit Bahnen versehen wurden, wie beim ersten Trennungslauf. Jede Probe und jedes Gemisch der Standardsteroide wurden je dreimal hintereinander in je 100 µl Essigsäureethylester : Methanol (2:1) gelöst und in der oben beschriebenen Weise auf die Folien aufgetragen.

Der Glastank für den Trennungslauf war ebenfalls mit Filterpapier ausgeschlagen. Als Laufmittel diente ein Gemisch aus Benzol : Essigsäureethylester im Verhältnis 4 : 1. Die Laufzeit betrug durchschnittlich 40 Minuten. Das Färben der Standards und die Bestimmung der Rf-Werte erfolgten auf dieselbe Weise wie beim ersten Trennungslauf.

Tabelle 3 zeigt die Rf-Werte der fünf acetylierten Steroide des zweiten Trennungslaufes.

Steroid	Rf	SD	VAR
Androstendion	0,205	0,019	0,093
Testosteron	0,343	0,032	0,093
DHT	0,487	0,023	0,047
Androsteron	0,527	0,026	0,049
Androstandiol	0,615	0,027	0,044

Tabelle 3: Arithmetische Mittel der Rf-Werte (n=90) der acetylierten Referenzsteroide nach Dünnschichtchromatographie im Laufmittel Benzol : Essigsäureethylester im Verhältnis 4 : 1.

Das Scannen der Folien, die Identifizierung der Peaks, das Abschaben des Kieselgels von der Folie, das Eluieren der acetylierten Steroide und schließlich das Auszählen der Counts im Szintillationszähler erfolgten ebenfalls in gleicher Weise wie beim ersten Trennungslauf. Abbildung 6 zeigt eine typische Scannerkurve der acetylierten Steroide des Bereiches 3 der ersten chromatographischen Auftrennung.

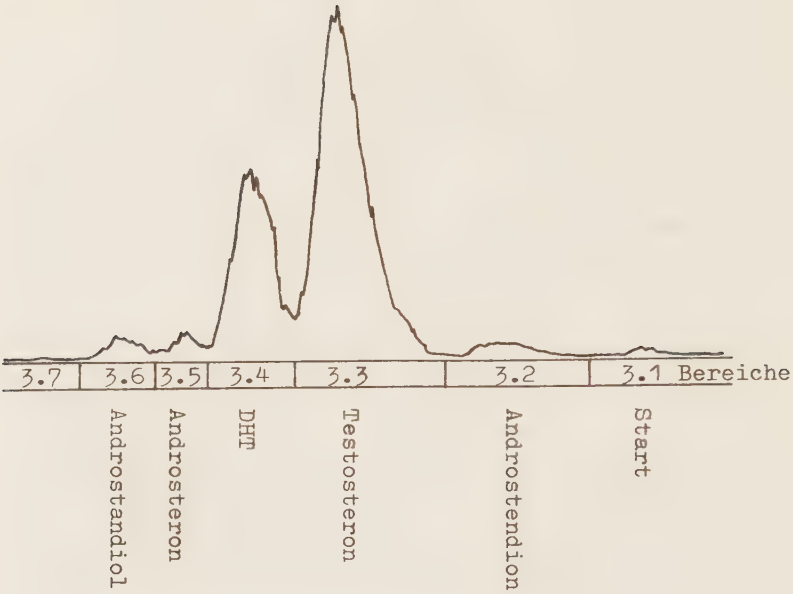

Abbildung 6: Dünnschichtchromatographische Auftrennung des Bereiches 3 (s. Abb. 5) des ersten Trennungslaufes nach Acetylierung.

4. E R G E B N I S S E

4.1. Versuchsergebnisse bei Zusatz von Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase zum Inkubationsmedium.

In einer besonderen Versuchsreihe wurde untersucht, ob ein Zusatz von Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase zum Inkubationsmedium einen Einfluß auf die Ergebnisse der Biokonversionsversuche hat.
Zu diesem Zweck wurde ein sehr großes Gewebestück homogenisiert und in 16 Portionen aufgeteilt. Von diesen wurden dann jeweils eine Probe mit Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (40 i.u. je Probe) und eine Probe ohne das Enzym in acht verschiedenen Zeiten inkubiert.
Die Ergebnisse dieses Versuches zeigt Tabelle 4.

Inkubationszeit (min)	Inkubationsmedium	Anteil der einzelnen Testosteron-Metabolite an der Gesamtradioaktivität in %						
		DHT	Androstandiol	Testosteron	Androstandion	Androstendion	Androsteron	unbek. Substanz
15	o	5,24	2,44	77,05	0,79	6,47	2,20	5,80
	m	5,71	4,28	75,84	0,72	6,02	1,88	5,55
30	o	5,75	2,36	63,15	6,39	10,39	1,97	9,95
	m	7,64	2,22	73,26	0,58	6,13	2,04	8,13
45	o	7,58	2,29	75,56	0,93	6,48	2,58	4,56
	m	7,66	1,55	77,98	4,91	6,14	2,35	3,82
60	o	9,60	3,68	65,69	5,67	7,25	2,92	5,18
	m	9,95	3,90	71,56	1,06	5,92	3,17	4,37
75	o	9,75	3,00	71,51	0,99	6,36	4,04	4,51
	m	9,25	4,22	70,46	1,22	5,89	4,31	4,63
90	o	10,88	3,60	69,30	1,25	1,40	2,15	11,40
	m	6,26	3,34	60,68	1,18	20,67	1,88	5,97
120	o	13,39	4,33	66,04	1,11	6,11	4,12	4,88
	m	13,84	4,34	68,94	0,91	1,00	4,25	6,70
150	o	13,29	4,39	62,37	4,93	6,17	3,96	5,01
	m	13,57	4,20	69,52	0,85	0,87	4,32	6,65

Tabelle 4

Tabelle 4:
Vergleich der Biokonversionsergebnisse bei Verwendung in Inkubationsmedien ohne Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase und Inkubationsmedien mit einem Zusatz von 40 I.U. Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase bei acht verschiedenen Inkubationszeiten.
O = ohne Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase
m = mit Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase

Die Ergebnisse der Tabelle 4 zeigen, daß ein Zusatz von Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase zum Inkubationsmedium keinen Einfluß auf die Ergebnisse der Biokonversionsversuche hat.
In den weiteren Versuchen wurde deshalb auf die Zugabe dieses Enzyms verzichtet.

4.2. Versuchsergebnisse ohne Zusatz von Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase zum Inkubationsmedium.

Schon das Aussehen der Scannerkurven (siehe Abb. 5 und Abb. 6) ließ die Ergebnisse der späteren genauen Auszählung grob erahnen.
Um sämtliche Ergebnisse der Biokonversionsversuche der verschiedenen Gewebeproben miteinander vergleichen und signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gewebearten feststellen zu können, mußte eine statistische Aufarbeitung der Ergebnisse durchgeführt werden.
In der vorliegenden Arbeit wurden die Ergebnisse anhand des Mann-Whitney-Tests untersucht.
Dieser Test dient zur Prüfung der Frage, ob die Merkmale zweier unabhängiger Grundgesamtheiten die gleiche Verteilung haben. Das Signifikanzniveau p gibt dabei die Wahrscheinlichkeit an, einen Fehler erster Art zu machen (26).

Der durchschnittliche prozentuale Anteil der einzelnen Steroide, die bei den Biokonversionsversuchen gebildet wurden, wurde aus den Durchschnittswerten der beiden Szintillationszählungen errechnet und nach klinischer Diagnose des Patienten und nach der histologischen Klassifizierung geordnet und verglichen.

Tabelle 5 zeigt die Ergebnisse sämtlicher Versuche in einer Übersicht.
Die Abbildungen 7 bis 12 zeigen die geordneten Gegenüberstellungen jeweils für die einzelnen Steroide.

Klin. Diagnose	Histo	n	DHT	Androstandiol	Testosteron	Androstandion	Androstendion	Androsteron
Adenom	D	6	18.83 ± 4.40	5.24 ± 1.83	68.35 ± 7.21	0.42 ± 0.12	1.77 ± 0.52	5.20 ± 3.35
	A	41	19.75 ± 5.40	5.89 ± 1.31	69.27 ± 6.17	0.36 ± 0.22	1.47 ± 0.50	3.37 ± 1.62
Incidental Karzinom	D	3	19.23 ± 2.97	3.86 ± 0.15	69.46 ± 5.65	0.29 ± 0.12	1.90 ± 0.37	5.26 ± 2.35
	A	4	20.06 ± 3.68	4.91 ± 1.27	65.24 ± 4.27	0.33 ± 0.40	2.01 ± 0.58	5.76 ± 1.21
Virginelles Karzinom	D	7	16.62 ± 4.27	4.32 ± 1.01	72.54 ± 6.30	0.40 ± 0.27	1.80 ± 0.49	4.30 ± 2.20
	A	14	20.96 ± 4.67	4.69 ± 1.69	63.59 ± 9.98	0.47 ± 0.37	2.19 ± 0.91	8.03 ± 5.37
	Ca I	7	12.09 ± 4.50	5.44 ± 1.88	75.87 ± 6.21	0.45 ± 0.28	1.98 ± 0.79	4.16 ± 2.15
	Ca II	8	11.69 ± 4.07	4.70 ± 2.55	76.86 ± 6.85	0.53 ± 0.36	1.95 ± 1.31	4.27 ± 4.18

Tabelle 5: Ergebnisse der ^{3}H-Testosteron-Biokonversion bei in vitro Inkubation von verschiedenen Drüsen-, Adenom- und Karzinomgeweben. Angaben der Mittelwerte (± Standardabweichung) in Prozent.

DHT = Dihydrotestosteron
D = Drüsengewebe
A = Adenomgewebe
Ca I = hochdifferenziertes Adenokarzinom
Ca II = wenig differenziertes Adenokarzinom

klin. Diagnose		Adenom		Incidental Karzinom		Virginelles Karzinom			
	Histo	D	A	D	A	D	A	Ca I	Ca II
Adenom	D	-	NS	NS	NS	NS	NS	0,05	0,05
	A	NS	-	NS	NS	NS	NS	0,05	0,01
Incid. Karzinom	D	NS	NS	-	NS	NS	NS	0,05	0,01
	A	NS	NS	NS	-	NS	NS	0,02	0,01
Virg. Karzinom	D	NS	NS	NS	NS	-	NS	0,05	0,05
	A	NS	NS	NS	NS	NS	-	0,02	0,01
	Ca I	0,05	0,05	0,05	0,02	0,05	0,02	-	NS
	Ca II	0,05	0,01	0,02	0,01	0,05	0,01	NS	-

Tabelle 6: Vergleich der Biokonversionsergebnisse (DHT). Angegeben ist das Signifikanzniveau p des Mann-Whitney Testes.

NS = kein signifikanter Unterschied

D = Drüsengewebe

A = Adenomgewebe

Ca I = hochdifferenziertes Adenokarzinom Ca II = wenig differenziertes Adenokarzinom

4.2.1. Testosteron-Biokonversion über den 17-OH-Weg

4.2.1.1. Biokonversion von Testosteron zu Dihytrotestosteron

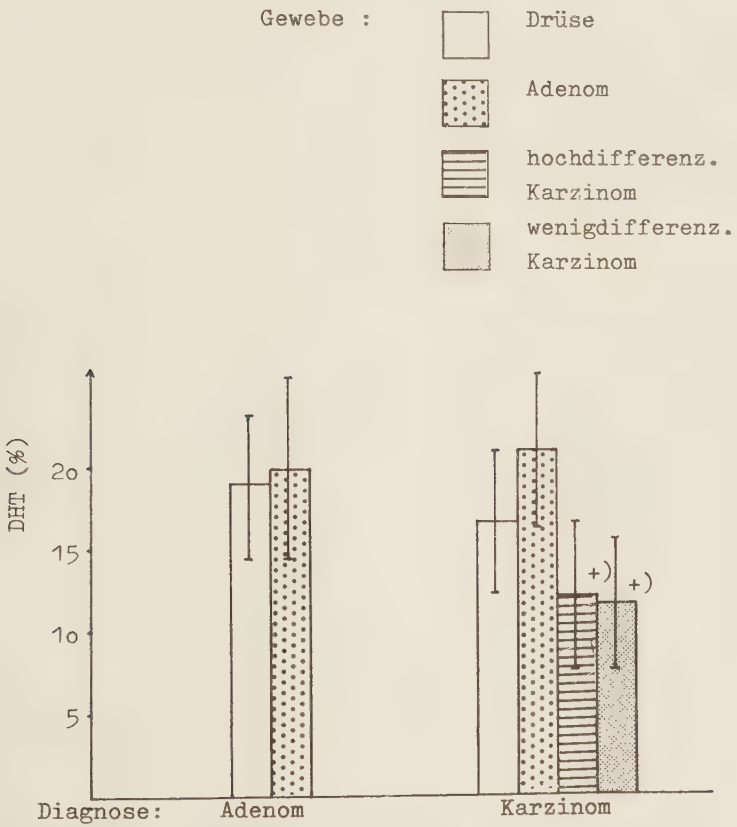

Abbildung 7: Biokonversion von Testosteron zu Dihydrotestosteron (DHT) in Prozent der Gesamthormonmenge.
+) = Signifikanter Unterschied gegenüber Drüsen- und Adenomgewebe von Adenomträgern bzw. Drüsen- und Adenomgewebe von Karzinomträgern.

Das Drüsengewebe des Adenomträgers zeigte eine signifikant höhere Biokonversion von Testosteron zu Dihydrotestosteron (DHT) als das hoch- und wenig differenzierte Karzinomgewebe des Karzinomträgers.
Das gleiche Verhalten gegenüber den Karzinomgeweben zeigten das Adenomgewebe des Adenomträgers sowie das Drüsen- und das Adenomgewebe des Incidentalkarzinomträgers.
Die anderen Gewebevergleiche ergaben keine signifikanten Unterschiede.

4.2.1.2. Biokonversion von Testosteron zu Androstandiol

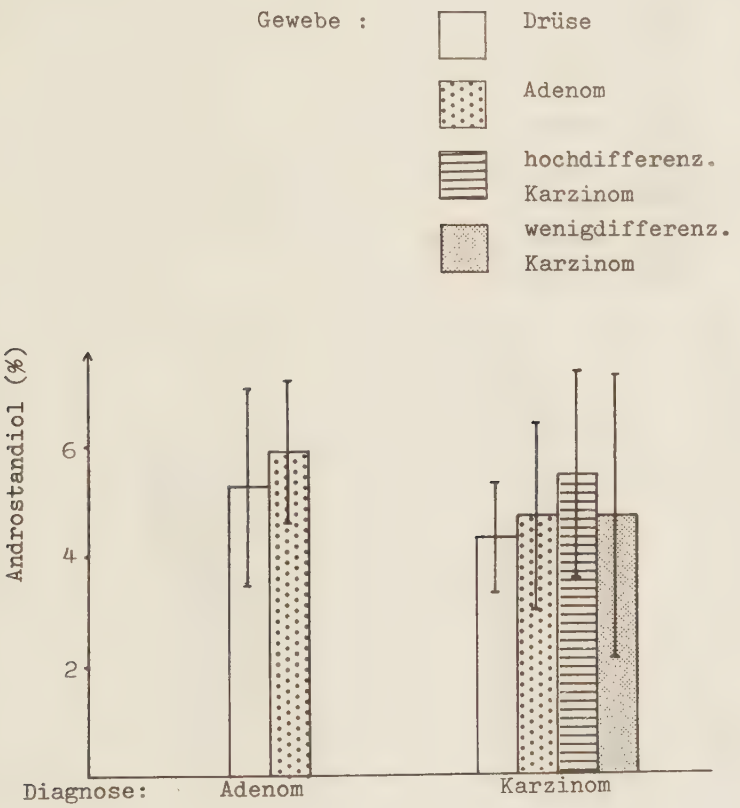

Abbildung 8: Biokonversion von Testosteron zu Androstandiol in Prozent der Gesamthormonmenge.

Die Konversionswerte von Testosteron zu Androstandiol waren insgesamt beim Karzinomträger gegenüber dem Adenomträger erniedrigt, zeigten bei statistischer Untersuchung jedoch keine Signifikanz.

4.2.2. Testosteronbiokonversion über den 17-Keto-Weg

4.2.2.1. Biokonversion von Testosteron zu Androstandion

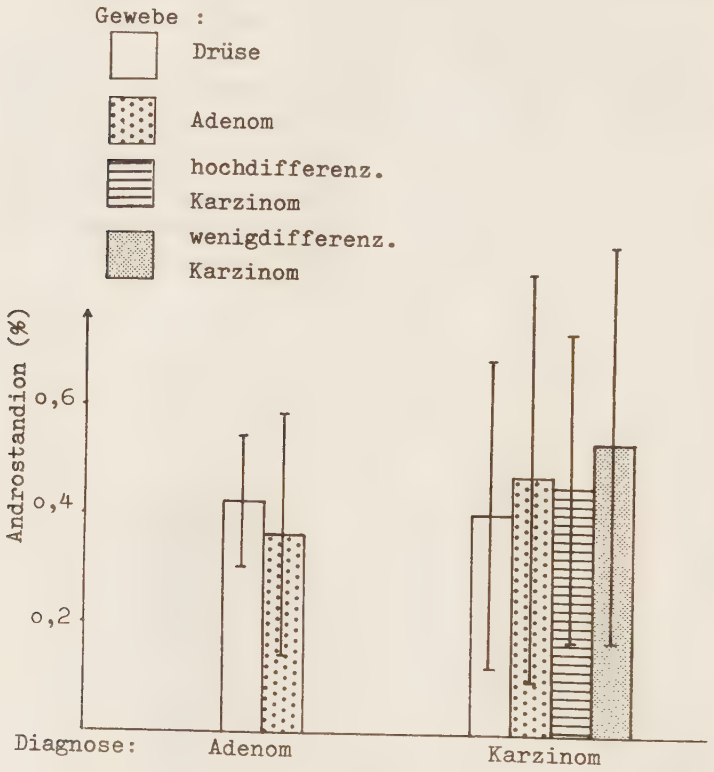

Abbildung 9: Biokonversion von Testosteron zu Androstandion in Prozent der Gesamthormonmenge.

Insgesamt wurde nur sehr wenig Androstandion gebildet. Zwischen den einzelnen Gewebearten bestand kein signifikanter Unterschied.

4.2.2.2. Biokonversion von Testosteron zu Androsteron

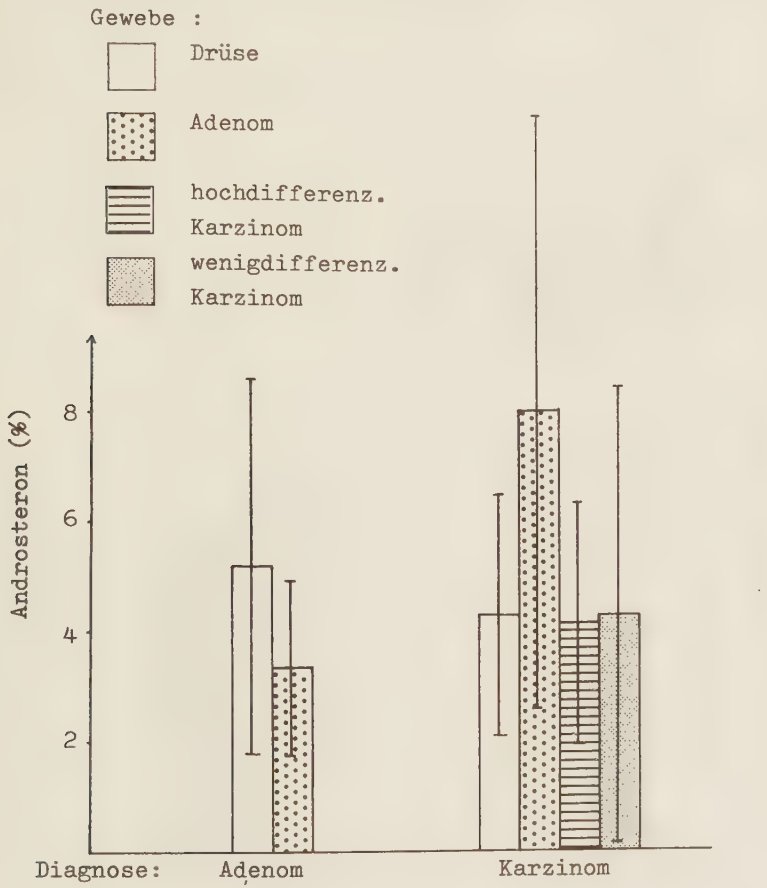

Abbildung 10: Biokonversion von Testosteron zu Androsteron in Prozent der Gesamthormonmenge.

Die Androsteronmetabolisierung war im Adenomgewebe des Karzinomträgers gegenüber den anderen Geweben erhöht. Sonst waren keine signifikanten Unterschiede vorhanden.

4.2.2.3. Biokonversion von Testosteron zu Androstendion

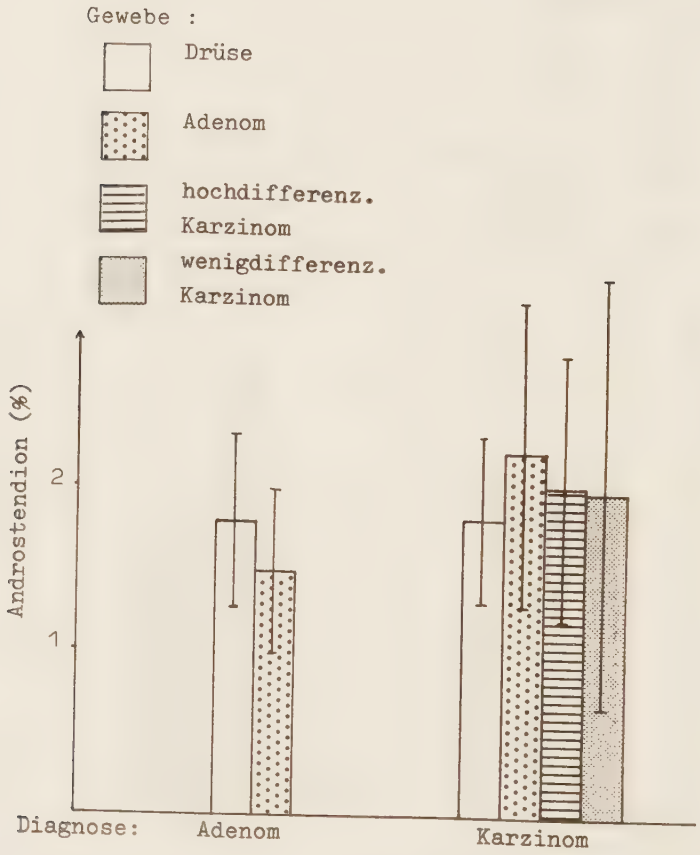

Abbildung 11: Biokonversion von Testosteron zu Androstendion in Prozent der Gesamthormonmenge.

Bei der Metabolisierung von Androstendion waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gewebearten vorhanden.

4.2.3. Nicht metabolisiertes Testosteron

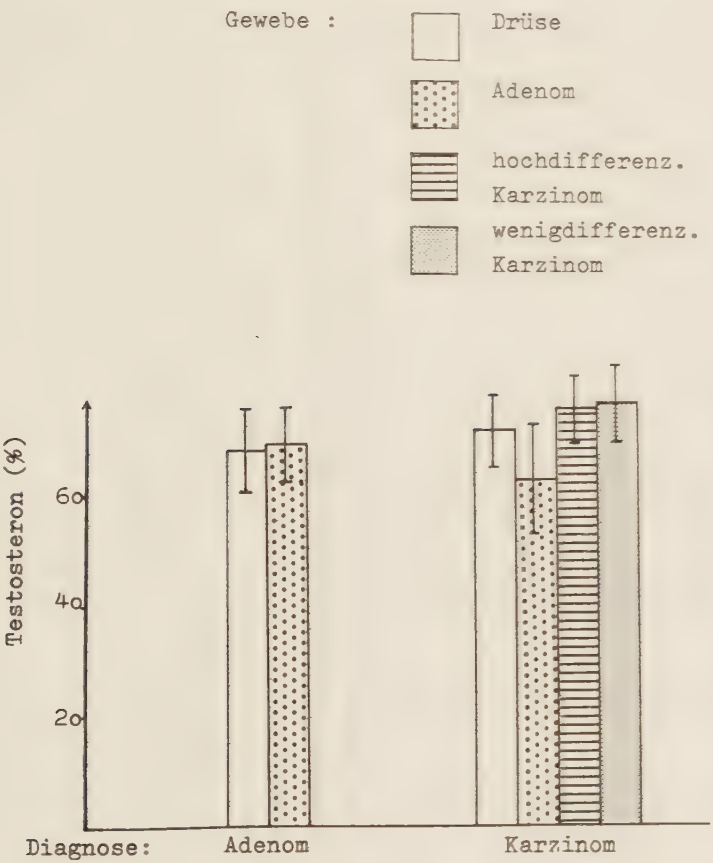

Abbildung 12: Anteil des nicht metabolisierten Testosterons in Prozent der Gesamthormonmenge.

Das nicht metabolisierte Testosteron stellte bei jeder Versuchsauszählung den größten Posten dar.
Zwischen den einzelnen Gewebearten ließ sich jedoch kein signifikanter Unterschied feststellen.

4.3. Vergleich der hier vorliegenden Ergebnisse mit denen von Grun (10).

Klinische Diagnose	Histo	n Grun	n Hier	DHT Grun	DHT Hier	Androstandiol Grun	Androstandiol Hier	Testosteron Grun	Testosteron Hier
Adenom	D	6	6	27.02	18.83	5.78	5.24	60.59	68.35
	A	14	41	22.64	19.75	5.25	5.89	65.59	68.77
Incidental	D	5	3	12.85	19.23	1.63	3.86	75.75	69.46
Karzinom	A	5	4	10.41	20.06	1.45	4.91	82.32	65.24
	D	8	7	11.23	16.62	1.94	4.32	79.70	72.54
Virginelles	A	6	14	26.77	20.96	3.72	4.69	87.64	63.59
Karzinom	Ca	17	15	4.10	11.87	1.90	5.04	87.64	76.40

Tabelle 7: Vergleich der Ergebnisse der ^{3}H-Testosteron-Biokonversion bei in vitro Inkubation von verschiedenen Drüsen-, Adenom- und Karzinomgeweben. Angaben der Mittelwerte in Prozent.

n = Anzahl der untersuchten Gewebeproben
D = Drüsengewebe
A = Adenomgewebe
DHT = Dihydrotestosteron
Ca = Karzinomgewebe

Unter "Grun" sind die Ergebnisse der Arbeit von Wolfgang Grun (10) aufgeführt, unter "Hier" die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit.

Um die Ergebnisse beider Arbeiten miteinander vergleichen zu können, wurden die Werte der vorliegenden Arbeit für hoch- und wenig differenziertes Karzinomgewebe zusammengefaßt, so wie es Grun in seiner Arbeit getan hat.

5. D I S K U S S I O N

5.1 5-alpha-Reduktase-Aktivität

Die Metabolisierung von Dihydrotestosteron (DHT) aus Testosteron wird direkt von der 5-alpha-Reduktase (3-oxo-5-alpha-Steroid-delta 4-Oxidoreduktase) katalysiert. Bruchowsky und Wilson (5) konnten zeigen, daß DHT das eigentliche androgene Wirkhormon ist. Beim Hund konnte durch Gabe von DHT sogar eine Prostatahyperplasie iatrogen induziert werden (9).

Nachdem Malathi und Gurpide (20) gezeigt haben, daß DHT fast ausschließlich zu Androstandiol auf dem 17-OH-Weg weitermetabolisiert wird und die bevorzugte Reaktionsrichtung eindeutig auf der Seite der Bildung von DHT liegt, ist es ausreichend, daß zur Beurteilung der 5-alpha-Reduktase-Aktivität die prozentualen Anteile von DHT herangezogen werden.
In diesem Punkt besteht Übereinstimmung mit verschiedenen anderen Autoren (21, 24, 17, 2, 16).

In der vorliegenden Arbeit zeigten sich signifikante Unterschiede in der Bildung von DHT nur beim Vergleich von Karzinomgeweben mit Adenom- und Drüsengewebe. Dies jedoch ungeachtet der Tatsache, ob das Adenom- oder Drüsengewebe von einer adenomatösen (BPH) oder einer karzinomatösen Prostata stammte (siehe Tabelle 6). Krieg et al. (19, 18) und Habib (11) kamen bei ihren Arbeiten zu dem gleichen Ergebnis. Gleiches gilt für Prout, Kliman et al. (21), obgleich ihre Resultate eine höhere Signifikanz aufweisen als diejenigen von Krieg et al. und die der vorliegenden Arbeit.

In diesem Zusammenhang scheint es interessant, die Frage zu prüfen, ob der Grad der Entdifferenzierung des Karzinomgewebes einen Einfluß auf die Bildung von DHT hat.
In der vorliegenden Arbeit fällt zunächst auf, daß bei direktem Vergleich von hoch- und wenig-differenziertem Karzinomgewebe kein signifikanter Unterschied festgestellt werden konnte.
Es ist jedoch auffällig, daß bei Vergleich der verschiedenen Karzinomgewebe mit anderen Geweben das wenig-differenzierte Karzinomgewebe eine deutlichere Signifikanz in der verminderten DHT-Bildung zeigt als das hochdifferenzierte Karzinomgewebe.
Daraus läßt sich schließen, daß mit zunehmendem Grad der Entdifferenzierung die 5-alpha-Reduktase-Aktivität im Karzinomgewebe abnimmt. Signifikanz tritt aber nicht, oder eventuell nur bei größerem Unterschied im Entdifferenzierungsgrad auf.
Jenkins und McCaffery (16) fanden jedoch 1974, daß im hochdifferenzierten Prostatagewebe die DHT-Produktion sich nicht von der in gesundem Drüsengewebe unterscheidet, daß aber im wenig-differenzierten Karzinomgewebe die Bildung von DHT vermindert ist.
Kliman, Prout et al. (17) haben zu dieser Frage Prostatakarzinommetastasen, die einen hohen Entdifferenzierungsgrad aufwiesen, mit Biopsie-Proben des Primärtumors, der besser differenziert war, verglichen. Sie fanden dabei eine um 76% reduzierte DHT-Bildung im Metastasengewebe. Jedoch war die Anzahl der untersuchten Proben nicht groß genug, um statistisch relevante Ergebnisse zu liefern. Krieg et al. (19) haben Karzinomgewebe verschiedener Differenzierungsgrade untersucht, stellten jedoch keine Unterschiede in der DHT-Bildung fest.

Einen besonderen Aspekt stellt der Vergleich mit der Arbeit von Grun (10) dar.

Er untersuchte mit der gleichen Methode Gewebespäne, die durch transurethrale Resektion mit der Elektroschlinge gewonnen wurden. Die Karzinomgewebeproben waren im Durchschnitt weniger differenziert als die Gewebe des vorliegenden Kollektives.
Grun fand ebenfalls die DHT-Bildung in Karzinomgeweben gegenüber Drüsen- und Adenomgeweben von BPH- und Karzinomträgern signifikant erniedrigt, obwohl die absoluten DHT-Bildungsraten deutlich unter denen der vorliegenden Arbeit liegen. Dies steht sehr wahrscheinlich in Zusammenhang mit der stärkeren Entdifferenzierung seiner Gewebeproben.
Eine Aussage über unterschiedliche DHT-Bildung je nach Differenzierungsgrad des Gewebes konnte er aufgrund des zu geringen Krankengutes nicht machen.

Bei der vorliegenden Untersuchung stand kein Gewebe gesunder Vorsteherdrüsen zu Vergüung. Es ist hier daher nicht möglich, Drüsengewebe gesunder Patienten mit anderen Gewebearten zu vergleichen.

Zwischen Drüsen- und Adenomgewebe konnte weder bei Karzinom-, noch bei BPH-Trägern ein signifikanter Unterschied festgestellt werden.
In diesem Zusammenhang seien die Untersuchungen von Siiteri und Wilson (24) erwähnt, obwohl sie mit der vorliegenden Arbeit nur bedingt vergleichbar sind, da hier Drüsengewebe als gesunder Teil einer erkrankten Prostata untersucht wurde und Siiteri und Wilson Drüsengewebe aus gesunden Vorsteherdrüsen verwendeten. Diese beiden Wissenschaftler fanden keinen signifikanten Unterschied zwischen gesundem Drüsengewebe und Adenomgewebe im Bezug auf die Biokonversion von Testosteron zu DHT.
Andere Autoren (25,8) fanden bei der Untersuchung des gleichen Themas die Bildung von DHT im Adenomgewebe gegenüber gesundem Drüsengewebe signifikant erhöht.

Besondere Erwähnung soll wiederum der Vergleich mit den Ergebnissen von Grun (10) finden. Er verglich - ebenso wie die vorliegende Arbeit - die Testosteron-DHT-Konversion zwischen Adenom- und Drüsengewebe von Karzinomträgern. Er fand in beiden Fällen keinen signifikanten Unterschied. Dies stimmt mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit überein.

Eine besondere Gruppe stellen die Träger von Incidentalkarzinomen dar. Diese wurden unter der Verdachtsdiagnose "Benigne Prostate-Hyperplasie" operiert. Erst bei der histopathologischen Untersuchung fand sich ein kleiner Bereich karzinomatösen Gewebes. Eine relevante Aussage über das Biokonversionsverhalten von Geweben von Incidental-Karzinomträgern ist in der vorliegenden Studie nicht möglich, da nur von einem Patienten Gewebeproben vorlagen. Jedoch soll die Tendenz nicht unerwähnt bleiben, daß sich Adenom- und Drüsengewebe von Incidental-Karzinomträgern ebenso verhält wie Adenom- und Drüsengewebe von BPH-Trägern.
Dies entspricht den Ergebnissen, die Grun (10) in seiner Arbeit fand.

5.2. 3-alpha-Hydroxy-Steroiddehydrogenase-Aktivität

Neben der 5-alpha-Reduktion von Testosteron zu DHT unterliegen Androgene einem weiteren enzymatischen Abbau durch die 3-alpha-Hydroxy-Steroiddehydrogenase mit Bildung von Androstandiol(13).
Des weiteren wird die Bildung von Androsteron aus Androstandion durch dieses Enzym katalysiert.
Malthi und Grupide (20) fanden, daß die Bildung von Androsteron jedoch fast ausschließlich über Androstandiol abläuft. Überdies war in den vorliegenden Versuchen Androstandion nur in allerkleinsten Mengen vorhanden. Somit wird durch Betrachtung des gebildeten Androstandiols und Androsterons die gesamte 3-alpha-Hydroxy-Steroiddehydrogenase-Aktivität erfaßt (siehe Abb. 1).
Die Abbildung 13 zeigt die Summe der prozentualen Anteile von Androstandiol und Androsteron.

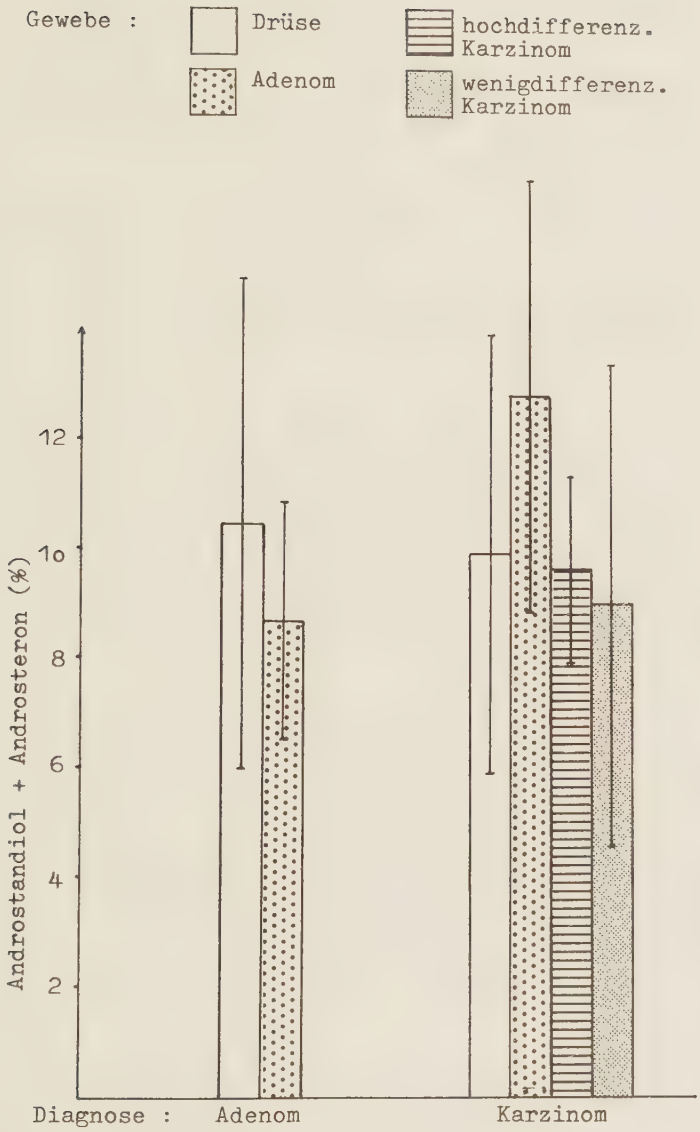

Abbildung 13: Summe der Biokonversionsanteile von Androstandiol und Androsteron in Prozent der Gesamthormonmenge.

Ein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Gewebearten konnte in diesem Falle nicht festgestellt werden. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Resultaten der Untersuchung von Shida et al. (23), die beim Vergleich von normalem und BPH-Gewebe ebenfalls keinen signifikanten Unterschied sahen.
Jakobi und Altwein (13) fanden jedoch einen signifikanten Unterschied in der 3-alpha-Hydroxy-Steroiddehydrogenase-Aktivität zwischen Karzinomgeweben unterschiedlichen Differenzierungsgraden, wobei die Aktivität mit zunehmender Entdifferenzierung abnahm.

Bruchovsky und Lieskovsky (4) zogen zur Beurteilung der 3-alpha-Hydroxy-Steroiddehydrogenase-Aktivität lediglich das aus DHT gebildete Androstandiol heran. Sie stellten dabei eine signifikant geringere Enzymaktivität im BPH-Gewebe als in normalem Drüsengewebe fest, obgleich sich die absoluten Werte des gebildeten Androstandiols nur geringfügig unterschieden. Auch wenn die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unter diesem Gesichtspunkt betrachtet werden (siehe Abb. 8), läßt sich doch zwischen den einzelnen Gewebearten kein signifikanter Unterschied feststellen.

Grun (10) fand in seinen Untersuchungen ebenfalls keinen signifikanten Unterschied zwischen Drüsen- und BPH-Gewebe und zwischen Karzinomgeweben unterschiedlicher Differenzierungsgrade.

5.3. 17-beta-Hydroxy-Steroiddehydrogenase-Aktivität

Die 17-beta-Hydroxy-Steroiddehydrogenase katalysiert die Reaktion, bei der die OH-Gruppe am Kohlenstoffatom 17 des Sterangerüstes durch eine Keto-Gruppe ersetzt wird. Dadurch entsteht aus Testosteron Androstendion, aus DHT Androstandion und aus Androstandiol Androsteron.
Zur Beurteilung der Aktivität dieses Enzyms wäre es daher erforderlich, die Metabolisierungsprodukte Androstendion, Androstandion und Androsteron zu betrachten.

Androstandion wurde in den vorliegenden Versuchen nur in allerkleinsten Mengen gebildet (siehe Abb. 9 - im Durchschnitt weniger als 0,45%), so daß auf Berücksichtigung dieses Steroids verzichtet werden kann. Dies gilt umso mehr, wenn man noch eine gewisse Ungenauigkeit, die in der Meßmethode begründet liegt, annimmt.

Ein sehr uneinheitliches Bild bietet die Betrachtung der Ergebnisse des gebildeten Androsterons (siehe Abb. 10). So schwanken zum Beispiel die Prozentwerte innerhalb der Gruppe des BPH-Gewebes von Karzinomträgern in einem Bereich zwischen 0,28% und 16.01%.
Dies hat seinen Grund möglicherweise in der unzureichenden Trennungsschärfe der Dünnschicht-Chromatographie im zweiten Trennungslauf. Die durchschnittlichen Rf-Werte lagen bei 0,487 für DHT und bei 0,527 für Androsteron. Daher erscheint es hier sinnvoll, die 17-beta-Hydroxy-Steroiddehydrogenase-Aktivität nur aufgrund des Androstendions zu beurteilen.
Collins et al. (6) verfuhren in der gleichen Weise und stellten dabei im BPH-Gewebe eine geringe Androstendion-Bildung fest.

die hier vorliegenden Ergebnisse zeigen die gleiche Tendenz. Eine Signifikanz konnte allerdings nicht festgestellt werden.

Bard und Lasnitzki (2) stellten 1977 bei ihrer Arbeit fest, daß die Bildung von Androstendion im Prostatakarzinomgewebe erhöht ist, ferner, daß der Differenzierungsgrad des Karzinomgewebes keinen Einfluß auf die Androstendion-Produktion hat.
Wie schon beim vorigen Vergleich, so zeigen auch bei diesem die hier vorliegenden Ergebnisse die gleiche Tendenz, aber ohne statistische Signifikanz.
Bard und Lasnitzki stellten darüberhinaus eine verstärkte Androstendion-Bildung in Karzinomgewebe mit zunehmendem Alter des Patienten fest.
Eine Aufstellung der hier untersuchten Karzinompatienten (Tab. 8) läßt diesen Schluß nicht unbedingt zu. Die zu geringe Zahl der Patienten erlaubt jedoch keine statistisch relevanten Schlußfolgerungen.

Patient	Alter	n	Androstendion (%)	SD
S.K.	49	5	1.634	0.60
F.E.	59	4	1.99	0.84
B.A.	59	2	1.27	0,07
H.B.	69	4	2.685	1.63

Tabelle 8: Vergleich der Androstendion-Bildung aus Testosteron in Karzinomgewebe in Prozent der Gesamthormonmenge unter Berücksichtigung des Patientenalters.
n = Anzahl der Gewebeproben SD = Standardabweichung

Beim Vergleich der hier zur Diskussion stehenden Ergebnisse mit der bereits mehrfach erwähnten Arbeit von Grun (10) fällt wiederum die große Übereinstimmung in den einzelnen Vergleichskriterien auf.

5.4. Der Einfluß der Methode der Gewebeprobengewinnung auf die Untersuchungsergebnisse

Die Gewebeproben, die in dieser Arbeit untersucht wurden, wurden durch suprapubische, transvesikale Prostatektomien gewonnen. Man kann davon ausgehen, daß die Gewebeproben dabei durch den glatten chirurgischen Schnitt mit dem Skalpell in ihrer biologischen und biochemischen Zusammensetzung nicht beeinflußt wurden.
Im Gegensatz dazu wäre es durchaus denkbar, daß die Gewebeproben, die durch transurethrale Resektion mit Resektionszystoskop und Elektroschlinge gewonnen wurden - wie dies bei der Untersuchung von Grun (10) der Fall war - durch Koagulation in ihrer biochemischen Beschaffenheit verändert wurden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit lehren aber das Gegenteil. In allen Diskussionspunkten, die zur Beurteilung des Testosteron-Biokonversion herangezogen wurden, stimmten die Resultate der Grun'schen und der vorliegenden Arbeit überein.
So läßt sich abschließend sagen:
Prostatagewebeproben, die durch transurethrale Elektroresektion gewonnen wurden, unterscheiden sich bezüglich des in vitro Testosteron-Biokonversionsverhaltens nicht von solchen Proben, die durch offene, chirurgische Prostatektomie gewonnen wurden.

5.5. Quantitativer Vergleich der vorliegenden Versuchsergebnisse mit denen anderer Autoren

Der qualitative Vergleich der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigte ein großes Maß an Übereinstimmung mit anderen Autoren; d.h. bei vergleichender Betrachtung zweier verschiedener Gewebearten wurde übereinstimmend ein signifikanter Unterschied in der Testosteron-Biokonversion festgestellt, bzw. übereinstimmend nicht festgestellt.

Die absoluten Biokonversionswerte unterscheiden sich jedoch stark von denen, die andere Autoren fanden.
In der vorliegenden Untersuchung wurde in Adenomgewebe von BPH-Patienten eine Konversionsrate von Testosteron zu DHT von durchschnittlich 19,75% gefunden.
Grun (10) fand bei der Untersuchung des gleichen Gewebes mit derselben Methode und verschiedener Art der Gewebegewinnung eine Konversionsrate von 22,64%.
Krieg (18) fand in seiner Arbeit bei dieser Gewebeart eine Konversionsrate von 35,7%. Jedoch verwandte er eine andere Versuchsmethode, und seine Gewebeproben waren bedeutend größer.
Prout, Kliman et al. (21) untersuchten mit einer weiteren Methode Gewebe, das durch Nadelbiopsie gewonnen wurde. Sie fanden in BPH-Gewebe eine Konversionsrate von Testosteron zu DHT von 27,0% bis 97,1%, im Durchschnitt 61,7%.

Diese beträchtlichen Unterschiede können verschiedene Ursachen haben.
Es wäre möglich, daß verschiedene Untersuchungsmethoden zu verschiedenen Ergebnissen führen. Dasselbe könnte auch für die Größe der Gewebeproben und damit für die Genauigkeit der histologischen Klassifizierung

gelten. Denkbar wäre auch, daß die unterschiedliche Art und Weise der Gewinnung der Gewebeproben innerhalb einer bestimmten Versuchsmethode keine Bedeutung hat, innerhalb einer anderen Methode dieser Unterschied jedoch zum Tragen kommt.
Es wird Aufgabe spezieller Untersuchungen sein, diese Fragen zu beantworten.

6. Z U S A M M E N F A S S U N G

Die in vitro Biokonversion von Testosteron im Drüsen- und Adenomgewebe von Patienten mit benigner Prostata-Hyperplasie (BPH) und in Drüsen-, Adenom- und Karzinomgewebe von Prostatakarzinomträgern wurde untersucht. Dabei wurden folgende Ergebnisse gefunden:

- Der Hauptmetabolit ist bei jeder Gewebeart Dihydrotestosteron (DHT).
- Die DHT-Bildung (und damit die 5-alpha-Reduktase-Aktivität) im Karzinomgewebe war signifikant niedriger als im Drüsen- und Adenomgewebe sowohl von BPH-, als auch von Karzinomträgern.
- Der Differenzierungsgrad des Karzinomgewebes hat keinen signifikanten Einfluß auf die DHT-Bildung. Sie scheint jedoch mit zunehmender Entdifferenzierung des Gewebes abzunehmen.
- Die Bildung der Steroide, die von der 3-alpha-Hydroxy-Steroiddehydrogenase abhängig sind - Androstandiol und Androsteron -, zeigt keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Gewebeart.
- Die Bildung von Androstendion scheint im Karzinomgewebe unabhängig vom Differenzierungsgrad erhöht zu sein. Signifikanz konnte jedoch nicht festgestellt werden.
- Zwischen Gewebeproben, die durch transurethrale Elektroresektion gewonnen wurden, und solchen, die durch offene, chirurgische Prostatektomie gewonnen wurden, besteht bei Anwendung derselben Untersuchungsmethode kein Unterschied bezüglich des Testosteron-Biokonversionsverhaltens. Jedoch erscheint die DHT-Bildung gegenüber Arbeiten mit anderen Untersuchungsmethoden deutlich niedriger.
- Ein Zusatz von Glucose-6-alpha-Dehydrogenase zum Inkubationsmedium hat keinen Einfluß auf die Versuchsergebnisse.

7. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1. Alken, C.E. und Sökeland, J.:
Urologie, 8. Auflage (1979)
Georg Thieme Verlag Stuttgart

2. Bard, D.R. und Lasnitzki, I.:
The influence of estradiol on the metabolism of androgens by human prostatic tissue
J. Endocr. 74, 1-9 (1977)

3. Bartsch, G., Müller, H.R,. Oberholzer, M., Rohr, H.P.:
Light microscopic stereological analysis of the normal human prostate and of benign prostatic hyperplasia
J. Urol. 122 (1979) 487-491

4. Bruchovsky, N. und Lieskovski, G.:
Increased ration of 5-alpha-Reductase: 3-alpha (beta)-hydroxy-steroiddehydrogenase activities in the hyperplastic human prostate
J. Endorc. 80, 289-301 (1979)

5. Bruchovsky, N. und Wilson, J.D.:
The intranuclear binding of testosterone and 5-alpha-androstane-17-beta-ol-3-one by rat prostate
J. Biol. Chem. 243, 5953-5960 (1968)

6. Collins, W.P. Koullapis, E.N., Bridges, C.E., und Sommerville, I.F.:
Studies on steroid metabolism in human prostatic tissue
J. Steroid Biochem. 1. 195-207 (1970)

7. DiSilverio, F., Gagliardi, V., Sorcini, G. und Sciarra, F.:
Biosynthesis and metabolism of androgenic hormones in cancer of the prostate.
Investigative Urology 13, 286 (1976)

8. Geller, J., Albert., Lopez, D., Geller, S. und Niawayama, G.:
Comparsion of androgen metabolites in benign prostatic hypertrophy (BPH) and normal prostate.
J. Clin. Endocr. 43, 686 (1976)

9. Gloyna, R.E., Siiteri, P.K., und Wilson, J.D.:
Dihydrotestosterone in prostatic hypertrophy II. The formation and content of dihydrotestosterone in the hypertrophic canine prostate and the effect of dihydrotestosterone on prostate growth in the dog.
J. of Clin. Invest. 49., 1746-1753 (1970)

9a. Grumbach, S.:
Vergleich der in vitro Bioconversion von Pregnenolon zwischen Ratten- und menschlichem Hodengewebe während der sexuellen Reifung
Med. Dissertation, Universität Tübungen (1978)

10. Grun, W.:
In vitro Untersuchung der Androgen-Biokonversion in normalem, adenomatösem und karzinomatösem Prostatagewebe
Med. Dissertation, Universität Tübingen (1983)

11. Habib, F.K., Lee, I.R., Stitch, S.R., and Smith, P.H.:
Androgen levels in the plasma and prostatic tissues of patients with benign hypertrophy and carcinoma of the prostate.

J. Endocrinol. 71, 99, (1976)

12. Huggins, C.:
The etiology of benign prostatic hyperplasia.
Bull. N.Y. Acad. Med. 23, 696 (1947)

13. Jacobi, G.H. and J.E. Altwein:
Androgenstoffwechsel im Prostatacarcinom: 3-alpha-Hydroxysteroid-Dehydrogenase-Aktivität in Abhängigkeit vom Tumordifferenzierungsgrad.
Urol. Int. 35, 194-205 (1980)

14. Jacobi, G.H., Gupta, D., Rathgen, G.H., Altwein, J.E.:
Hormone dependence of prostatic carcinom: Serum androgens, plasma SHBG and prostatic androstanediol formation in untreated patients.
In: Wittliff, J.L., Dapunt, O. (Herausgeber)
Steroid receptors and hormone dependent neoplasia.
Masson Publ. New York (1980)

15. Jacobi. G.H. Rohr, H.P. und Bartsch, G.:
Endokrinologie und Wachstum der Prostata in:
Urologie in Klinik und Praxis.
Hohenfellner, R. und Zingg, E.J. (Herausgeber)
Georg Thieme Verlag Stuttgart (1983)

16. Jenkins, J.S. and V.M. MCCAFFERY:
Effect of oestradiol-17 beta and progesterone on the metabolism of testosterone by human prostatic tissue.
J. Endocr. 63, 517-526 (1974)

17. Kliman, B., Prout, Jr., G.R., MacLaughlin, R.A., Daly, J.J., and Griffin, P.P.:
Altered androgen metabolism in metastatic prostate cancer.
J. Urol. 117, 623 (1978)

18. Krieg, M., Bartsch, W., Janssen, W. und Voigt, K.D.:
A comparative study of binding, metabolism and endogenous levels of androgens in normal, hyperplastic and carcinomatous human prostate.
J. of Steroid Biochem. 11, 615-624 (1979)

19. Krieg, M., Grobe, I., Voigt, K.D., Altenähr, E. und Klosterhalfen, H.:
Human prostatic carcinoma: significant differences in its androgen binding and metabolism compared to the human benign prostatic hypertrophy.
Acta Endocr. 88, 497-507 (1978)

20. Malathi, K., and Gurpide, E.:
Metabolism of 5-alpha-dihydrotestosterone in human benign hyperplastic prostate.
J. Steroid Biochem. 8, 141 (1977)

21. Prout, Jr., G.R., Kliman, B., Daly, J.J., MacLaughlin, R.A., and Griffin, P.P.:
In vitro uptake of ^{3}H testosterone and its conversion to dihydrotestosterone by prostatic carcinoma and other tissues.
I.Urol. 116, 603 (1976)

22. Sciarra, F., Sorcini, G., DiSilverio, F., and Gagliardi, V.:
Testosterone and 4-androstenedione concentration in peripheral and spermatic venous blood of patients with prostatic adenocarcinoma. Effects of diethylstilbesterol and cyproterone acetate therapy.
J. Steroid Biochem. 2, 313 (1971)

23. Shida, K., Shimazaki, J., Ito, Y., Yamanaka, H., and Nagai-Yuasa, H.:
3-alpha-reduction of dihydrotestosterone in human normal and hypertrophic prostate tissues.
Investigative Urology 13, 241 (1975)

24. Siiteri, P.K. and Wilson, J.D.:
Dihydrotestosterone in prostatic hypertrophy.
1. The Formation and content of dihydrotestosterone in the hypertrohphic prostate of man.
J. Clin. Invest. 49, 1737 (1970)

25. Vermeulen, A., and De Sy, W.:
Androgens in patients with benign prostatic hyperplasia before and after prostatectomy.
J. Clin. Endocr. 43, 1250 (1976)

26. Weber, H.:
Einführung in die Wahrscheinlichkeitsrechnung und Statistik für Ingenieure.
B.G. Teubner, Stuttgart (1983)

27. Sinha, A.A., Blackard, C.E. und Seal, U.S.:
A critical analysis of tumor morphology and hormone treatments in the untreated and estrogen-treated responsive and refractory human prostatic carcinoma.
Cancer 40, 2836-2850 (1977)

28. Gupta, D.:
Prostate cancer: Hormone profiles in: Prostate cancer.
Jacobi, G.H. und Hohenfellner, R. (Herausgeber)
Williams and Wilkins, Baltimore/London (1982)

Danksagung

Besonders zu Dank verpflichtet bin ich Herrn Prof. Dr.D. Gupta für die Überlassung des Themas und für viele nützliche Hinweise zur Erstellung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. K.H. Bichler und Herrn Oberarzt Dr. St.H. Flüchter danke ich vielmals für die Überlassung der Gewebeproben einschließlich der histologischen Diagnosen.

Zuletzt möchte ich Wolfgang Grun für die Einführung in die Arbeitsmethode meinen besten Dank sagen.

LEBENSLAUF

Am 23. April 1957 wurde ich als Sohn des Anton Springer und seiner Frau Bärbel in Hechingen geboren.
Von 1964 bis 1967 besuchte ich die Grundschule in Hechingen. Nach dem Umzug nach Saulgau besuchte ich dort ab 1967 das Gymnasium, wo ich 1976 die Reifeprüfung ablegte.
Von 1976 bis 1978 leistete ich Wehrdienst in der Bundeswehr.
Im Wintersemester 1978/79 begann ich das Studium der Zahnheilkunde an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen. Dort legte ich am 17. März 1981 die zahnärztliche Vorprüfung und am 5. Dezember 1983 die zahnärztliche Staatsprüfung ab.

Offsetdruck Spengler
Lessingstraße 4 · 7401 Neustetten 1
Telefon (0 74 72) 2 21 45